

# UNIVERSIDAD DE CUENCA



## FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

### MAESTRIA EN REPRODUCCIÓN ANIMAL

**“Eficacia de la radiación ultravioleta en la esterilización del plasma seminal porcino y su comportamiento sobre calidad espermática”.**

*Tesis de grado previo a la obtención del título de Magister en Reproducción Animal.*

**AUTOR: Dr. Wilmer Wilfrido Ordóñez Arias. MVZ.**

**C.I. 0103863437**

**DIRECTOR: MVZ. Diego Antonio Valdez Jojoa. Mg. Sc.**

**C.I. 0301717070**

**CUENCA, ECUADOR**

**2017**



## RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la Radiación Ultravioleta de Onda Corta (UV-C) como medio esterilizador de Plasma Seminal Porcino y su comportamiento sobre la calidad espermática. Donde se empleó un diseño de Bloques al azar conformados por 4 verracos de los que se obtuvo 4 eyaculados por cada uno divididos en 5 alícuotas para los tratamientos planteados dando un total de 80 unidades experimentales. Los tratamientos fueron: A.- sin exposición; B.- 5 minutos de exposición; C.- 10 minutos de exposición; D.- 15 minutos de exposición, y E.- 20 minutos de exposición. Se empleó una cámara de esterilización de radiación UV-C de 254nm, 12W. Se evaluó concentración de UFC/ml, motilidad individual progresiva, vitalidad, anormalidades e integridad de la membrana espermática. La reducción bacteriana significativa se obtuvo a partir de los 15 minutos de exposición a la radiación ultravioleta tipo C obteniéndose 93,8% de muestras esterilizadas. Los parámetros de vitalidad espermática, anormalidades e integridad de la membrana no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos ( $P>0,05$ ) mientras que la motilidad espermática progresiva fue diferente ( $p<0,05$ ) siendo menor en el semen reconstituido con plasma seminal con mayor exposición a la radiación UV-C. Se concluye que la radiación UV-C reduce la carga bacteriana significativamente a medida que aumenta el tiempo de exposición a la radiación UV-C.

**Palabras claves:** Cerdo, Plasma Seminal, Radiación Ultravioleta, Bacteria.



## ABSTRACT

The objective of the present work was to evaluate the effect of Ultraviolet Short Wave Radiation (UV-C) as a Porcine Seminal Plasma sterilizer and its behavior on sperm quality. Where a random Blocks design was used, consisting of 4 boars from which 4 ejaculated each were divided into 5 aliquots for the raised treatments giving a total of 80 experimental units. The treatments were: A.- no exposure; B.- 5 minutes of exposure; C.- 10 minutes of exposure; D.- 15 minutes of exposure, and E.- 20 minutes of exposure. A 254nm, 12W UV-C radiation sterilization chamber was used. Concentration of CFU / ml, progressive individual motility, vitality, abnormalities and sperm membrane integrity were evaluated. Significant bacterial reduction was obtained from 15 minutes of exposure to ultraviolet radiation type C obtaining 93.8% of sterilized samples. The parameters of sperm vitality, abnormalities and membrane integrity did not show significant differences between treatments ( $P > 0.05$ ), whereas progressive sperm motility was different ( $p < 0.05$ ), being lower in semen reconstituted with semen plasma With greater exposure to UV-C radiation. It is concluded that UV-C radiation reduces bacterial load significantly as the exposure time to UV-C increases.

Key words: Pig, Seminal Plasma, Ultraviolet Radiation, Bacterium.



## TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	2
ABSTRACT .....	3
TABLA DE CONTENIDOS .....	4
LISTA DE CUADROS.....	7
LISTA DE GRAFICOS .....	8
CLÁUSULA DE DERECHOS DE AUTOR.....	9
CLÁUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL. ....	10
AGRADECIMIENTOS .....	11
DEDICATORIA .....	12
ABREVIATURAS Y SIMBOLOGIA .....	13
CAPITULO I: INTRODUCCIÓN.....	14
1.1.- Objetivos:.....	16
1.1.1.- Objetivo General. ....	16
1.1.2.- Objetivos específicos. ....	16
CAPITULO II: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	17
2.1.- El Semen porcino.....	17
2.1.1.- La Colección del Semen .....	17
2.1.2.- Valoración seminal .....	18
2.2.- Plasma Seminal Porcino.....	19
2.2.1.- Características y Composición.....	19
2.2.2.- Propiedades. ....	19
2.3.- Bacteriosis Seminal Porcina. ....	21
2.3.1.- Bacterias contaminantes del Plasma. ....	22
2.3.2.- Cantidades de Unidades Formadoras de Colonias (UFC)/ml para generar una afección reproductiva .....	23
2.3.3.- Efectos Negativos de la contaminación seminal porcina.....	24



2.4.- Uso de Antibióticos en Diluyentes y sus complicaciones .....	25
2.5.- Radiación Ultravioleta (R-UV) como antibacteriano del Plasma Seminal porcino. ....	25
2.5.1.- Tipo de Radiación. ....	26
2.5.2.- Mecanismo de acción.....	26
2.5.3.- Usos de la Radiación Ultravioleta de Onda Corta (UV-C) .....	27
2.5.4.- Ventajas de la luz ultravioleta.....	28
2.5.5.- Desventajas de la luz ultravioleta .....	28
2.6.- Agar Sangre como cultivo bacteriológico .....	29
CAPITULO III: MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
3.1.- Materiales .....	29
3.1.1.- Físicos .....	29
3.1.2.- De Laboratorio.....	30
3.1.3.- Biológicos.....	30
3.1.4.- Químicos .....	30
3.2.- Métodos .....	30
3.2.1.- Ubicación de la investigación .....	30
3.2.2.- Animales .....	31
3.2.3.- Descripción de las unidades de análisis.....	31
3.2.4.- Recolección.....	32
3.2.5.- Manejo del Plasma Seminal (PS) y tratamientos con UV-C.....	33
3.2.6.- Reconstitución y Evaluación de la calidad espermática .....	33
3.2.7.- Cultivo Bacteriano del Plasma Seminal.....	35
3.2.8.- Cultivo Bacteriano del Pellet .....	35
3.2.9.- Diseño Experimental .....	35
3.2.10.- Tratamientos .....	35
3.2.11.- Variables de la investigación .....	36



3.2.12.- Análisis estadístico.....	36
CAPITULO IV: RESULTADOS .....	37
4.1.- Efecto de los tratamientos (UV-C) sobre la carga bacteriana en el plasma seminal y los parámetros de calidad espermática pos reconstitución del semen porcino. ....	37
CAPITULO V: DISCUSIÓN .....	38
CAPITULO VI: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	40
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	41
ANEXOS.....	47
Anexo 1.- Pruebas de Chi-cuadrado ( $X^2$ ) para recuento bacteriano .....	48
Anexo 2.- Prueba de Kolmogorov-Smirnov para las variables en estudio (normalidad).....	49
Anexo 3.- Prueba del Estadístico de Levene para la homogeneidad de las varianzas. ....	50
Anexo 4.- Análisis de varianza de las variables paramétricas. ....	51
Anexo 5.- Prueba de Kruskal-Wallis para las variables no paramétricas .	52
Anexo 6.- Análisis de Laboratorio .....	53
Anexo 7.- Organigrama de trabajo utilizado en el laboratorio Irquis. ....	58
Anexo 8.- Registro de resultados para la reconstitución .....	59
Anexo 9.- Fotografías de trabajos en la Granja .....	60
Anexo 10.- Fotografías de trabajos en el Laboratorio .....	61



## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1.- Bacterias encontradas en los eyaculados. ....	22
Cuadro 2.- Características de la ubicación. ....	31
Cuadro 3.- Clasificación de la Motilidad en Masa.....	32
Cuadro 4.- Resultados de R UV-C y la reconstitución en cada tratamiento. ....	37



## LISTA DE GRAFICOS

Gráfico 1.- Tratamiento con UV-C Modifica el ADN bacterial. ....	27
Gráfico 2.- Cultivo bacteriano en Agar Sangre (Galindo, 2010).....	29
Gráfico 3.- Granja Experimental Irquis – Universidad de Cuenca Fuente: Google Hearth.....	31





## CLÁUSULA DE DERECHOS DE AUTOR.

**WILMER WILFRIDO ORDÓÑEZ ARIAS** autor de la tesis “**Eficacia de la Radiación Ultravioleta en la esterilización del plasma seminal porcino y su comportamiento sobre calidad espermática**”, reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito previo a la obtención del título de **MAGISTER EN REPRODUCCIÓN ANIMAL**. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implica afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autor.

Cuenca, a 22 de mayo de 2017.

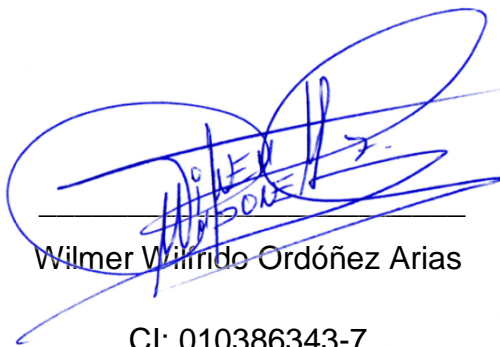
Wilmer Wilfrido Ordóñez Arias

CI: 010386343-7

## CLÁUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL.

**WILMER WILFRIDO ORDÓÑEZ ARIAS** autor de la tesis “**Eficacia de la Radiación Ultravioleta en la esterilización del plasma seminal porcino y su comportamiento sobre calidad espermática**”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, a 22 de mayo de 2017



Wilmer Wilfrido Ordóñez Arias

CI: 010386343-7



## AGRADECIMIENTOS

A mis padres Rolendio y Carmelina quienes estuvieron pendientes de mi progreso profesional, y estoy seguro están muy orgullosos de su hijo.

A mi esposa e hijos que me apoyan y soportan diariamente y hacen que mis días sean más felices y llenos de objetivos.

Al MVZ Diego Valdez Jojoa. Mg. Sc. por transmitir su meritorio conocimiento en la realización de este proyecto de investigación.

A la Universidad de Cuenca por poner a disposición su Laboratorio para la realización de este trabajo como también a sus encargados del mismo el Mg. Sc. Patricio Bueno y Mg. Sc. Daniel Argudo, quienes colaboraron con su valiosa guía.

Al Sr. Germán Pesantez dueño de “Granja Porcina Gullancay.” por poner a nuestra disposición sus construcciones.

A la MVZ. Diana Brito por su valiosa colaboración en la búsqueda de Bibliografía.

Estoy profundamente agradecido a todas las personas que no he nombrado, pero que contribuyeron en la realización de este estudio.

Wilmer Ordóñez A.



## DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi esposa que día a día lucha a mi lado, a mis tres hijos Tomas, Daniel Andrés, y mi peque que está por nacer porque de ellos depende mi bienestar.

A todos mis hermanos en especial a mi hermano Rodrigo ya que fue el que me impulso desde el inicio de mi carrera hasta llegar donde estoy muchas veces cumpliendo el papel de Padre.

Wilmer Ordóñez Arias.



## ABREVIATURAS Y SIMBOLOGIA

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>DCA</b>	Diseño Completo al Azar
<b>HOST</b>	Hipoosmótico
<b>LPS</b>	Lipopolisacáridos
<b>MIP</b>	Motilidad Individual Progresiva
<b>NM</b>	Nanómetros
<b>PS</b>	Plasma Seminal
<b>R-UV</b>	Radiación Ultravioleta
<b>RV- C</b>	Radiación Ultravioleta de Onda Corta
<b>UFC</b>	Unidades Formadoras de Colonias
<b>UFC/ml</b>	Unidades Formadoras de Colonias por centímetro cúbico
<b>μl</b>	Microlitros
<b>UV</b>	Ultravioleta



## CAPITULO I: INTRODUCCIÓN

La recolección y procesamiento de semen de cerdo utilizado para programas de mejora genética en inseminación Artificial (IA) en fresco y congelado es afectado por la contaminación bacteriana que se origina durante la colecta y/o en el laboratorio (Althouse, 2008). Las bacterias comúnmente encontradas en el semen porcino son: *Echerichia coli*, *Staphylococcus áureos*, *Psuedomonas*, *Proteus vulgaris*, *Streptococcus spp*, *Psedomonas aeruginosa*, *Enterobacter*, y *Klebsiella* (Yuraima, 2007; Maroto et al,2010). Evidenciándose que estas bacterias podían provenir del personal que colecta el semen como también se encontró que son nativas del medio ambiente (Okazaki *et al.*, 2012) (Conza *et al.*, 2004) (Kuster *et al.*, 2016).

Las consecuencias de la contaminación bacteriana que afectan al semen porcino están relacionadas con efectos deletéreos sobre calidad espermática alterando la estructura de la membrana, afectando su motilidad (Althouse et al., 2008; Martin,2010), aglutinación de esperma, disminución de la viabilidad, reduciendo las tasas de fertilidad, así como acorta la vida útil de las dosis seminales en el macho; y, en la hembra causa infecciones uterinas, retorno al celo, además están relacionadas con muerte embrionaria, baja fecundación y disminución del tamaño de la camada (Acosta et al., 2011; Maroto et al., 2010; Graham et al., 1971; Johnson et al., 2000; Martínez, 1984).

Como medida inhibitoria del desarrollo microbiano se realiza la inclusión de antibióticos a los medios de conservación del semen (Córdova, 2015), Breciana et al., (2014) muestra que el semen porcino colectado por la técnica de mano enguantada, el 62,5 % de las muestras y 79% de dosis preparadas se encontraban contaminadas, además su investigación demostró que la contaminación bacteriana fue del 63% de las muestras que contenían en el diluyente amikacina y gentamicina y que además generaron resistencia a estos antibióticos.

Los antibióticos comúnmente empleados en los medios de congelación espermática son penicilinas, estreptomycin, amikacina, y gentamicina, estos actúan contra las bacterias que podrían estar presentes en el semen manteniendo el desarrollo de los microorganismos al mínimo por la bacteriólisis causada (Rodríguez, 2014). La



bacteriólisis causada por los antibióticos hace que los Lipopolisacáridos (LPS), presentes en la pared celular de las bacterias sean liberados actuando como endotoxinas para los espermatozoides al estimular los receptores de contacto (TLR) induciendo la apoptosis y anormalidad de la membrana espermática, reduciendo de esta manera la motilidad y la habilidad de congelación de los espermatozoides (Okazaki *et al.*, 2012), proceso que es favorecido por el período de almacenamiento que tienen las dosis seminales (17°C) ya que promueven un estado de incubación de las bacterias resistentes (Acosta, 2013).

Se han hecho grandes esfuerzos para descubrir los efectos biológicos del plasma seminal (PS) sobre la función espermática y criotolerancia de los espermatozoides porcinos y la adición de PS antes o después de la criopreservación mostrando resultados variables, probablemente debido a las diferencias en la composición del plasma seminal con respecto a las proteínas presentes en el mismo ya sea relacionadas con la individualidad animal, alimentación e incluso entre eyaculados de un mismo individuo (Vilagran *et al.*, 2014) (Barranco *et al.*, 2015). Adicionado a los diluyentes para la conservación del semen brindó mejoras significativas en la viabilidad y movilidad espermática, prolongando la vida útil de los espermatozoides con la consiguiente mejora en la fecundidad de la cerda (Domínguez *et al.* 2015).

Con el propósito de reducir o eliminar la presencia de bacterias en el plasma seminal porcino se planteó este trabajo investigativo enfocado en el empleo de la radiación ultravioleta de onda corta (UV-C) como medio de esterilización en el PS. Este sistema es ampliamente empleado para la purificación del agua de bebida y en la industria alimenticia para el tratamiento de jugos de frutas, leche de coco y néctares, demostrándose que la radiación UV-C no altera las características organolépticas de los diferentes productos de consumo (Cruz *et al.*, 2014) (Vásquez *et al.*, 2011) (Oviedo *et al.*, 2013). Y además esta siendo utilizada en la desinfección tanto del equipo como del agua de preparación de diluyentes seminales según la empresa Minitube que publica en el año 2014.

La luz ultravioleta constituye una parte del espectro electromagnético, con longitudes de onda entre 100 y 400 nanómetros (nm), siendo las longitudes de 200 a 280nm (254nm) las consideradas germicidas (Vásquez *et al.*, 2011). El blanco principal de la



luz UV-C es el material genético de los microbios (bacterias, hongos, virus, algas, protozoarios) cuya acción biológica está enfocada en una reacción fotoquímica irreversible sobre el ADN del microorganismo alterando los procesos de replicación celular inactivando la reproducción bacteriana. En los sistemas actuales de esterilización por radiación UV-C, la efectividad está sujeta a tiempo y distancia de exposición, así como a la concentración microbiológica del medio a esterilizar; en el caso de los líquidos, se ha obtenido resultados favorables con una penetración de luz de 5mm pero la turbidez afecta negativamente la eficiencia de la radiación UV-C (Oviedo *et al.*, 2013) (Jones *et al.*, 2013). Este método de esterilización no genera impactos negativos en el medio ambiente puesto que no usa sustancias químicas para alcanzar su objetivo, además no deja residuos químicos ni modifica las características de los productos (Vásquez, *et al.* 2011)

La pregunta que nos planteamos en esta investigación es saber cuál de los tiempos entre 5, 10, 15, y 20 minutos expuestos a radiación de UV-C (254nm) a 20 cm de distancia de la lámpara y un espesor de la muestra de 5mm generaría una mayor afección contra las bacterias contaminantes del plasma seminal porcino y de esta manera proponer una nueva herramienta bactericida que nos ayudara a combatir esta problemática reproductiva del ganado porcino.

## **1.1.- Objetivos:**

### **1.1.1.- Objetivo General.**

- Evaluar la eficacia de cuatro tiempos de exposición con rayos UV-C al plasma seminal como acción antiséptica y su comportamiento en calidad seminal.

### **1.1.2.- Objetivos específicos.**

- Determinar el tiempo óptimo de exposición para la máxima esterilización por radiación UV-C del plasma seminal porcino.
- Evaluar calidad espermática de verracos posterior a la reconstitución con plasma seminal expuesto a rayos UV.





## CAPITULO II: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1.- El Semen porcino.

En cerdos la primera eyaculación puede ocurrir al iniciar la pubertad comprendida entre los 5 y 6 meses de edad y alcanza su madurez al año de edad. El eyaculado del verraco consta de tres fracciones: a) pre-espermática, compuesta principalmente por plasma seminal, es de color transparente, líquida, de escaso volumen y suele tener una carga altamente contaminante (Kubus, 2010), b) espermática, de aspecto lechoso, contiene una elevada concentración de espermatozoides; y c) fracción post-espermática de color blanquecino-transparente por su gran contenido de plasma seminal, aquí se encuentran los corpúsculos gelatinosos originados en las glándulas de Cowper, su función es evitar el reflujo del eyaculado al sellar el cérvix (De mercado, 2011).

#### 2.1.1.- La Colección del Semen

La colecta de semen se realiza mediante 2 métodos: Vagina artificial y la mano enguantada (Campos, 2015). En la actualidad la técnica de mayor difusión es la mano enguantada. Para lo cual el verraco es debidamente entrenado, se la realiza en una sala con un potro fijo, con condiciones sanitarias y de seguridad adecuadas tanto para el animal como para el operador (Kubus, 2010). El material que este en contacto con el líquido seminal debe estar limpio y esterilizado y a una temperatura de 37°C, una vez obtenido el semen se debe llevar al laboratorio para su respectivo análisis (Campos, 2015).

La primera fracción del eyaculado debe ser descartada, debido a que este líquido no contiene espermatozoides pero puede contener residuos uretrales/orina) y una alta cantidad de bacterias, solo se colecta la fracción rica en espermatozoides (Bonet et al., 2013).

La eyaculación puede durar de 5 a 7 minutos y el volumen del eyaculado suele ser superior a 300ml, dependiendo de factores como: edad, tamaño, técnica de colecta y la frecuencia con la que es recogido la muestra (Althouse et al., 2001).



Después de la recolección, el filtro con gel debe ser descartado (Bonet et al., 2013), por otro lado León (2006) manifiesta que la recolección se completa en 5 – 10 minutos con una media de 8 minutos y que una recolección de 6 minutos da aproximadamente 300ml de esperma, conteniendo  $95 \times 10^9$  /ml de espermatozoides, la cifra media de concentración del eyaculado completo del verraco es de 300.000 espermatozoides por ml y que una dosis seminal de semen diluido comprende entre 3000 y  $7000 \times 10^6$  de espermatozoides / dosis de 100ml.

### 2.1.2.- Valoración seminal

En la valoración seminal del cerdo nombraremos aspectos como: El volumen, que puede ir desde 200–300ml (Sancho & Vilagran, 2013), puede variar dependiendo de las características individuales del verraco, tales como raza, edad, capacidad reproductiva y condiciones ambientales (Sancho & Vilagran, 2013), se puede determinar directamente desde el tubo colector de semen en ml (Agüero, 2012). El Color es normal cuando poseen un aspecto blanco cremoso, considerándose los colores rojizos o amarillentos como anormales que a su vez indican contaminación de la muestra durante la eyaculación (Córdova et al., 2015). La Motilidad se expresa como el porcentaje (%) de células móviles bajo un campo microscópico, para ello, se coloca una pequeña gota de semen sobre el porta objetos previamente temperada a (37 °C) superpuesta con un cubreobjetos, se mira bajo un microscopio, en al menos 4 campos diferentes con un lente de 40X aumentos; Estas lecturas se promedian entonces 0 a 100% (Althouse et al., 2001), el espermatozoide con motilidad progresiva individual es aquel que se mueve de un punto a otro en una línea más o menos recta (Morillo y col., 2012). La Concentración se realiza mediante el método de hemocitómetro, utilizando la cámara de Neubauer (para conteo de glóbulos rojos), el conteo de los espermatozoides se realiza de los cinco cuadrantes al azar y se saca un promedio, este se multiplica por  $10^7$  para obtener una concentración por  $\text{cm}^3$  (Galarza, 2013). Y la evaluación de la morfología espermática es una herramienta eficaz para estimar la función del epitelio seminífero y la maduración epididimal, esta evaluación se la puede realizar con un microscopio de contraste de fase el cual proporciona una mejor resolución sin necesidad de realizar la tinción de las muestras (Sancho & Vilagran, 2013).



## **2.2.- Plasma Seminal Porcino.**

El plasma seminal es un fluido que contiene a los espermatozoides y las secreciones provenientes del epidídimo y principalmente de las glándulas sexuales accesorias durante la eyaculación (Vilela, 2014).

### **2.2.1.- Características y Composición.**

El plasma seminal tiene un pH que varía entre 7,3 y 7,9 y está compuesto por agua en un 94- 98% (Bonet, García & Sepúlveda, 2013), iones, azúcares, ácidos orgánicos, hormonas, aminoácidos y proteínas (Vilela, 2014). La composición del plasma seminal varía entre especies y entre individuos (Maxwell et al., 2007) inclusive entre eyaculados de un mismo individuo debido probablemente a patologías, época del año, estado fisiológico del animal o alimentación (Hernández, 2013).

Las proteínas son las que destacan por su cantidad e importancia, éstas se pueden clasificar en tres grupos: Proteínas ricas en cisteína (CRISP), Proteínas que contienen fibronectina tipo II (Fn-2), y espermadhesinas (Rodríguez-Martínez et al., 2011).

Otro compuesto del plasma seminal son los prostasomas que son relacionados con procesos de estabilización de membranas, que previenen la capacitación y la reacción agnómica espontánea (Hernández, 2011). También se destacan enzimas como  $\gamma$ -glutamyl-transferasa (GGT) y fosfatasa alcalina (ALP) los cuales tienen influencia en la calidad seminal y en la función de la membrana además de participar en diferentes procesos metabólicos durante la maduración espermática. También existen iones como el Zinc (Zn) y el Selenio (Se) que están implicados en la funcionalidad espermática por poseer propiedades antioxidantes (López et al., 2013).

### **2.2.2.- Propiedades.**

Las funciones que cumple el plasma seminal es la proteger y nutrir a los espermatozoides durante la eyaculación (Mann y Lutwak-Mann, 1981), además regula la capacitación espermática y la actividad del sistema inmune del tracto genital de la cerda (Orzolek et al., 2015), interviene en el transporte espermático en el tracto genital femenino y la capacidad fecundante (Vilela, 2014) es una rica fuente de nutrientes, sales tamponantes, péptidos, (glico) proteínas y hormonas (Rodríguez et al., 2011,



López et al. 2013). Algunas de estas sustancias (es decir, prostaglandinas, estrógenos, etc.) pueden inducir las contracciones uterinas y promover el transporte de espermatozoides, mientras que otros (glicoproteínas, citoquinas / quimiocinas, RNAs) Puede influir en la supervivencia de los espermatozoides, la ovulación femenina, el sistema inmunológico femenino y la fertilidad resultante (Rodríguez et al., 2011).

Hoy en día es muy común el uso del plasma seminal o algunos de sus componentes (proteínas) por sus propiedades nutritivas, protectoras, reguladoras y capacitadoras que confieren a los espermatozoides (Caballero et al., 2004; Barrios et al., 2005; Hernández et al., 2007; Maxwell et al., 2007) Hernández et al., (2007); Pech et al., (2011) mencionan que el plasma seminal aumenta el porcentaje de viabilidad, motilidad, e integridad de la membrana del acrosoma y del ADN de los espermatozoides del semen de verraco ya que ejerce un efecto protector sobre ellos durante el proceso de criopreservación., lo cual coincide con un estudio realizado por Domínguez (2015) quien utilizó plasma seminal en diferentes concentraciones logrando determinar un aumento significativo de la viabilidad y movilidad espermática en comparación a los otras concentraciones.

La utilización de semen refrigerado (15-20°C) bordea el 99% de las inseminaciones artificiales realizadas en el mundo, quedando relegada la utilización de semen congelado/descongelado, bien a labores de investigación, o bien a la incorporación de nuevo material genético de alto valor a núcleos de selección, por lo que en la producción comercial porcina no se están aprovechando las grandes ventajas que la criopreservación seminal puede aportar, como el mayor control sanitario de las dosis o la gran disponibilidad espacio/temporal del material seminal.

La criopreservación de los espermatozoides produce diferentes daños en la célula espermática como consecuencia del choque frío, el estrés osmótico y la formación de cristales de hielo intracelular durante la congelación y posterior descongelación. Diversos protocolos de criopreservación incluyen la adición de ciertos aditivos a los diluyentes de congelación espermática entre los que se puede incluir el plasma seminal y sus proteínas como posibles estabilizadores de las membranas plasmáticas de los espermatozoides con la finalidad de aumentar su resistencia inhibiendo los



cambios estructurales y fisiológicos que se producen al momento de ser criopreservados (Hernández, 2011; De mercado, 2011).

La inseminación con semen criopreservado tiene un rendimiento reproductivo inferior al obtenido con semen refrigerado, dos o tres lechones menos en la camada, ya que presentan una mayor susceptibilidad a la criopreservación que la mayoría de las especies domésticas. Se cree que el daño sufrido por el proceso de criopreservación podría inducir un efecto en los espermatozoides similar a la capacitación o al envejecimiento prematuro, asociado a un incremento de la fragmentación del ADN, En una investigación realizada se utilizó distintas concentraciones de PS 0, 10 y 50% en diferentes tiempos de incubación (0, 1, 2, 3, y 4) horas, encontrándose resultados significativos en semen de cerdo incubados con esta cantidad sobre la integridad de la membrana plasmática y fecundidad de la cerda (Domínguez, 2015).

Se ha podido encontrar que para la criopreservación se descarta el plasma seminal por medio de la centrifugación por lo que los espermatozoides pierden la protección antioxidante que ejerce el plasma seminal debido a que la composición de la membrana plasmática constituye una alta proporción de ácidos grasos polinsaturados (70%) que son susceptibles a la peroxidación lipídica en presencia de ERO (Especies reactivas al oxígeno) ocasionando una disminución de oxígeno lo que afecta la supervivencia y la capacidad fecundante de los espermatozoides (Hernández, 2013).

En un estudio realizado por León (2006), encontró que adicionando el 20% de plasma autólogo hubo diferencias significativas de viabilidad espermática de 56% en semen sin plasma frente a 76% del semen con plasma.

### **2.3.- Bacteriosis Seminal Porcina.**

El grado de contaminante de microorganismos es un parámetro importante a considerar al momento de utilizar semen para inseminación artificial o monta directa (Maroto et al., 2010).

En la contaminación bacteriana del semen de verraco las principales fuentes de contaminación son: de origen animal, medio ambiente y el hombre. La primera fuente



incluye líquidos prepuciales (Althouse y Lu, 2005), y del aparato génito-urinario (Conza et al., 2004) debido a que los genitales externos transportan diferentes microorganismos, aunque la mayoría de ellos forman parte de la flora normal, existen bacterias oportunistas (Acosta, 2010), también pueden proceder de heces, secreciones respiratorias, piel y cabello. La segunda fuente encierra agua contaminada, recolección, procesamiento y almacenamiento (Althouse 2008; Bonet et al., 2013), en condiciones higiénicas deficientes y contaminación humana (Althouse y Lu, 2005).

### 2.3.1.- Bacterias contaminantes del Plasma.

Las bacterias comúnmente relacionadas con el plasma seminal del cerdo las podemos describir en el cuadro 1.

**Cuadro 1.- Bacterias encontradas en los eyaculados.**

Encontradas frecuentemente en el semen	Fuente:	Consecuencia
Staphylococcus aureus	Tracto reproductor del macho; infección	Lesiones en el tracto; sangre en el eyaculado; infertilidad del semental
Leptospiras	Ambiente	No causa infertilidad a menos que el número de bacterias sea excesivo
Escherichia coli	Ambiente. Habita normalmente en el intestino de los animales. Resistente a la gentamicina.	Se ha observado un efecto directo espermicida (posiblemente por la producción de toxinas). Causa aglutinación
Eubacterium suis	Prepucio	Se ha aislado de descargas bulbares. Causa problemas de infertilidad. Problemas asociados con esta son más comunes cuando se usa monta natural
Klebsiella spp, Citrobacter spp, Micrococcus spp, son otras bacterias encontradas comúnmente en los eyaculados.		
Streptococcus spp	Tracto reproductor, localizado en testículos; se ha aislado de próstata	Problemas de fertilidad asociados a su efecto en la producción de espermatozoides y / o a la infección del tracto reproductor femenino.



<i>Proteus vulgaris</i>	Ambiente	No causa infertilidad a menos que el número de bacterias sea excesivo
Brucellosis	Infección del semental; localizado en los testículos.	Orquitis; semen contaminado; infertilidad del semental por degeneración testicular.
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	Tracto reproductor	Puede causar inflamación y degeneración testicular
<i>Mycoplasma hyosynoviae</i>	Tracto reproductor	Afecta la calidad seminal
<i>Serratia</i> spp	<i>Serratia marcescens</i> - contaminación ambiental. Patogénica en animales, causa mastitis en bovinos. En un estudio se encontró contaminando diluyente en polvo. Es resistente a la gentamicina.	ph ácido, aglutinación de células espermáticas, baja motilidad masal, daño acrosomal.
<i>Corynebacterium</i> spp	Tracto reproductor; se ha aislado de glándulas vesiculares	
<i>Enterobacter</i> spp	<i>Enterobacter cloacae</i> - contaminación ambiental. En un estudio se encontró contaminando el equipo desechable (re-utilizado) de dosificación. Es patógeno oportunista. Resistente a la gentamicina	ph ácido, aglutinación de células espermáticas, baja motilidad masal, daño acrosomal.
<i>Acinetobacter</i> spp.	Se encuentra en animales y en el ambiente. Resistente a la gentamicina	Aglutinación de eyaculados
<i>Alcaligenes</i> spp	Tracto intestinal de vertebrados. Es oportunista. Resistente a gentamicina <i>Alcaligenes faecalis</i> – aislado de prepucio	Aglutinación de eyaculados

Fuente: (Acosta et al., 2010)

### 2.3.2.- Cantidades de Unidades Formadoras de Colonias (UFC)/ml para generar una afección reproductiva

Muchos investigadores han comprobado que la contaminación bacteriana del eyaculado porcino es inevitable y que el número de bacterias en el eyaculado puede variar de menos de 1.000 UFC/ml a más de 100.000 UFC/ml (Althouse y Lu 2005). Sin embargo Acosta et al., (2010) considera una flora bacteriana anormal a partir de las 10 UFC/ml o cuando una bacteria específica logra sobrevivir en el semen, observándose un aumento de la frecuencia de retornos a celo. En otra investigación realizada por Maroto et al. (2010) mostraron que el tamaño de la camada se redujo al contaminarse el semen con *Escherichia coli* evidenciando un valor por encima de  $3.5 \times 10^3$  UFC/ml, en otra investigación con la inoculación de *E. coli* al semen de cerdo luego de la IA de  $5 \times 10^3$  UFC/ml encontraron que la motilidad espermática disminuyó



significativamente a partir del día 3 como también afecto el número de lechones al nacer (Jin Sa, 2014)

### **2.3.3.- Efectos Negativos de la contaminación seminal porcina**

La presencia de altas cargas microbianas está relacionada con la pérdida de motilidad espermática, reducción de la fecundación y muerte embrionaria (Martínez et al., 1984).

La presencia de microorganismos en el semen causan un efecto letal sobre la función del espermatozoide, ya sea afectando directamente la estructura espermática, afectando la motilidad o provocando una reacción prematura del acrosoma o indirectamente al estimular la producción de anticuerpos que puede ser dirigida contra el glicocáliz de la espermatozoide (Althouse y Lu, 2005).

#### **- Efectos sobre los Espermatozoides**

La presencia de bacterias en el plasma seminal incrementa el riesgo de infertilidad, una disminución de la motilidad espermática (Fujita, 2011; Mirjyn, 1999), aglutinación por su adherencia a las membranas de los espermatozoides (Bonet et al., 2013). También puede afectar la membrana celular de los espermatozoides provocando fenómenos de aglutinación, reducción en el tiempo de conservación (Acosta et al., 2011).

La *Escherichia coli* produce un efecto directo espermicida debido a la producción de toxinas (Acosta et al., 2010) Esto fue demostrado por un estudio realizado en el cual se analizaron concentraciones de *Escherichia coli* enterotoxigénica y cepas de verotoxigénica en el semen de verraco, encontrándose una alta prevalencia de ambas bacterias en las granjas (Thomson 2001).

Sánchez (1994) recomienda que para disminuir la contaminación se colecte solamente la fracción rica del eyaculado del verraco. Los leucocitos aumentan en una infección bacteriana produciendo una disminución de la motilidad espermática (Fujita, 2011).

#### **- Efectos sobre el aparato reproductor Femenino**





La presencia de bacterias ocasiona efectos negativos en los espermatozoides alterando el plasma seminal, constituyendo una fuente de contaminación para el tracto genital de la hembra (Mirjyn, 1999), lo que provoca muerte fetal y endometritis (Bonet et al., 2013), reducción de la fecundación (Conza et al., 2004) (Sepúlveda et al., 2014), estros repetitivos y descargas vaginales luego de la inseminación (Acosta et al., 2011). El útero de la cerda es resistente a las bacterias, pero en el momento del estro se vuelve susceptible a la endometritis por el aumento de la progesterona que se da en la fase luteal (Kuster, 2015).

#### **2.4.- Uso de Antibióticos en Diluyentes y sus complicaciones**

La adición de antibióticos a los extensores de semen para controlar el crecimiento de microorganismos en el semen está estipulada por directrices internacionales (Morrell & Wallgren, 2014). Por lo que como medida alternativa se utiliza antibióticos de amplio espectro en el diluyente siendo los antibióticos más comunes amikacina, gentamicina, neomicina, amoxicilina, penicilina (Bonet et al., 2013).

El uso de antibióticos está relacionado con el desarrollo de resistencia bacteriana, lo cual es un problema en animales y humanos (Namula et al., 2013) coincidiendo con Bonet et al., (2013) quien indica que los antimicrobianos deben estar presentes en una concentración que proporcione suficiente producto activo fácilmente disponible ya que deben ser capaces de permear las bacterias en cierto grado, y deben ocupar también un número suficiente de sitios activos del microorganismo, y durante un tiempo suficiente para asegurar su efecto perjudicial. Si hay interferencias en este proceso esto conduce a la aparición de resistencia antimicrobiana.

#### **2.5.- Radiación Ultravioleta (R-UV) como antibacteriano del Plasma Seminal porcino.**

La R-UV es una radiación no ionizante, que actúa a una longitud de onda entre 100 a 400 nm (Vásquez et al., 2010). La luz UV se caracteriza o se clasifica como germicida, es decir, puede inactivar microorganismos como bacterias, virus y protozoos. Esta capacidad ha permitido la adopción generalizada de la luz UV como una forma respetuosa con el medio ambiente, ya que no participan sustancias químicas y es eficaz frente a microorganismos perjudiciales (Ecured, 2007).



### 2.5.1.- Tipo de Radiación.

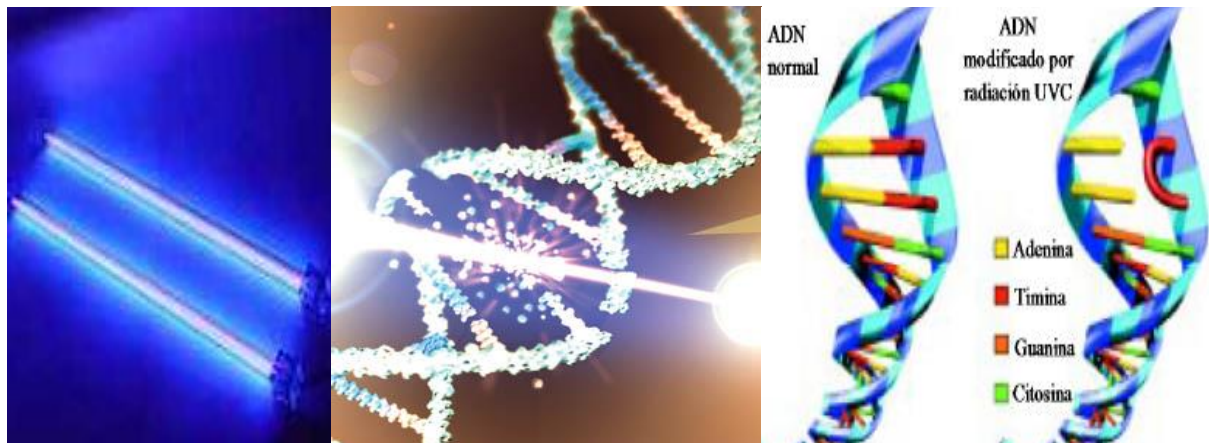
La luz UV se clasifica en tres tipos: UV de onda larga UV – A que va entre 315-400nm (longitud de onda) se emplea comercialmente para el bronceado de la piel y el tratamiento de la psoriasis, UV de onda media UV–B entre 280-315nm se usa en el tratamiento de Goeckerman para la psoriasis y parece ser efectiva en el tratamiento del prurito urémico y UV de onda corta UV– C entre 200 a 280nm; es la porción más energética del espectro, es la más reconocida por su acción germicida a 254 nm, valor que se ha reportado como el óptimo para efectos bactericidas (Oviedo, et al. 2013; Domínguez, 2011).

### 2.5.2.- Mecanismo de acción.

A diferencia de los antibióticos convencionales la exposición a radiación UV-C que penetra es fuertemente absorbido por los ácidos nucleicos (ADN) de un microorganismo causando el rompimiento de los enlaces (Pietrobon, 2002), provocando la formación de uniones covalentes formando dímeros de pirimidina (Allende, 2003) lo que produce distorsiones en la forma del ADN e interfiere en el apareamiento normal de las bases. El resultado final es la inhibición de la síntesis de ADN, del crecimiento y la reproducción microbiana (Vignoli, 2006) y por consiguiente su muerte (Pietrobon, 2002). Por lo tanto, cuando estos microorganismos se exponen a la radiación UV de 254 nm, ésta atraviesa la pared celular, llega hasta el núcleo, y si encuentra una región del ADN con dos timinas adyacentes, una de las bases absorbe un fotón (energía UV) y se forma un dímero de alta energía. Estos dímeros impiden la replicación correcta del ADN, de forma que este método de desinfección se basa en la formación de suficientes parejas de dímeros para impedir la reproducción celular (López - Díaz, 2012).

La alta capacidad del ADN de absorber la radiación UV-C se debe a las bases nitrogenadas, tanto las purinas como las pirimidinas, siendo estas últimas las más sensibles, especialmente la timina. La timina es la única base que tras la exposición a la radiación UV-C sufre una reacción fotoquímica formando fuertes enlaces covalentes entre ellas (dímeros de timina) que alteran gravemente el material genético. Cuando las moléculas de timina son dimerizadas, se hace muy difícil a los ácidos nucleicos para replicarse y si la replicación se produce a menudo produce un defecto que impide que el microorganismo sea viable. (Dai et al., 2012)

### Gráfico 1.- Tratamiento con UV-C Modifica el ADN bacterial



**Fuente:** (López- Díaz, 2012)

#### 2.5.3.- Usos de la Radiación Ultravioleta de Onda Corta (UV-C)

Aunque la R-UV como antiséptico del semen porcino es desconocida, sin embargo existen numerosas evidencias que muestran con mucho éxito su uso antibacterial relacionados con productos alimenticios.

##### En Productos Alimenticios

- En la esterilización de líquidos (agua, jugos, néctares) mediante el empleo de radiación UV-C se ha podido eliminar el 99,9% con una penetración de radiación de 5mm, disminuyendo su efectividad al aumentar la turbidez (Jones, *et al.* 2013). Como también aumentar la vida útil conservando su calidad sensorial (López, 2012).
- En el empaquetado, transporte y conservación de productos alimenticios (frutas y hortalizas) con la finalidad de prolongar su vida comercial. (Allende, 2003; Lenntech, 2016).
- Se ha empleado especialmente como una alternativa para el tratamiento de aguas (Pietrobon, 2002) destruyendo más del 99.9% de bacterias, virus y gérmenes patógenos (EcuRed, 2010).

##### En el agua del Diluyente de conservación seminal porcina

Dado que el 95% del diluidor de semen consta de agua, la calidad del agua utilizada puede tener consecuencias significativas, las principales causas de contaminación del



agua utilizada en el diluyente por preparación inadecuada del agua y el almacenamiento y también recontaminación después de que el extensor haya sido preparado y esté listo para usar. La radiación UV permite la desinfección de la cuba vacía o llena de agua (Hy Vat) antes de la producción y desinfecta continuamente durante la producción; Los gérmenes presentes en las superficies de la cuba, en la tapa y en el agua para la preparación del diluyente pueden destruirse eficazmente para evitar la contaminación de los extensores el semen de jabalí y del propio semen de cerdo diluido (Minitube, 2014; Riesenbeck, 2015).

#### **2.5.4.- Ventajas de la luz ultravioleta**

El uso de luz ultravioleta poseen varias ventajas ya que no genera subproductos dañinos para la salud (Pietrobon, 2002), no alteran el olor, sabor, pH, conductividad, química (Lenntech, 2016), el tratamiento no produce residuos químicos ni radiación, no produce alteraciones organolépticas en la mayor parte de los alimentos (Domínguez, 2009), además no representa riesgos para el operador y su mantenimiento es simple y fácil pues no afecta la ecología debido a que no requieren el almacenamiento de sustancias químicas peligrosas, esta técnica no es costosa, desinfecta diversas superficies y sobretodo es eficaz para la inactivación de varios microorganismos (Domínguez, 2011)

#### **2.5.5.- Desventajas de la luz ultravioleta**

- La capacidad de penetración es mínima, en organismos protegidos por partículas, polvo o cubiertas, siendo únicamente eficaz en superficies o en agua y otros líquidos claros, puede afectar negativamente porque causa la degradación de antioxidantes (López, 2012).
- La luz UV-C es ineficaz en superficies ocultas, poros u orificios donde puedan encontrarse las bacterias (Vásquez et al., 2010).
- Los microorganismos pueden reparar los efectos destructivos de la radiación UV mediante un “mecanismo de reparación” también conocido como foto reactivación (Domínguez, 2009).

- Al trabajar con UV-C se debería considerar los riesgos que representan para la salud humana ya que existen evidencias contundentes de problemas cutáneos y oculares a los que se les atribuye a las lámparas utilizadas en los quirófanos ortopédicos con fines terapéuticos (Memarzadeh, 2010).

## 2.6.- Agar Sangre como cultivo bacteriológico

Es un medio de cultivo de alto valor nutritivo que permite el desarrollo de todo tipo de bacterias, está constituida por musculo de corazón, peptona, cloruro de sodio para mantener un balance osmótico y sangre en un 5-10% como de cordero, humana, caballo y de conejo. Una muestra se siembra directamente sobre la superficie por inóculo diluido en estrías zig-zag o bien sea por hisopado y posterior dilución en siembra en abanico. Se incuba por 24 hrs. a 37°C para su lectura (Galindo, 2010).



Gráfico 2.- Cultivo bacteriano en Agar Sangre (Galindo, 2010).

## CAPITULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1.- Materiales

#### 3.1.1.- Físicos

- Vasos de poliuretano capacidad 250 ml
- Bolsas de polietileno
- Caja térmica
- Frascos estériles de 100ml
- Papel toalla absorbente



- Guantes de polivinilo no empolvados
- Jeringuillas estériles de 3ml
- Termo para colecta de 500ml
- Termo para traslado del semen
- Termómetro
- Maniquí metálico
- Cámara Fotográfica

### **3.1.2.- De Laboratorio**

- Baño María (Memert® 10Lts.)
- Cabina de flujo Laminar BBS.H1300
- Estufa (Memert®)
- Centrífuga PCL 05
- Microscopio Cx31RBSFA
- Platina térmica 120 55 /0010
- Equipo de esterilización UV-C Modelo (D-395)
- Porta y cubreobjetos
- Cajas Petri
- Pipetas de 5, 10, 20, 200, 1000 microlitros (µl)

### **3.1.3.- Biológicos**

- 16 eyaculados completos.

### **3.1.4.- Químicos**

- Tinción supravital de eosina-nigrosina.
- Solución hipoosmótica de citrato de sodio y fructosa.
- Alcohol 70° GL.

## **3.2.- Métodos**

### **3.2.1.- Ubicación de la investigación**

Esta investigación fue realizada dentro la provincia del Azuay. Los cerdos fueron trasladados para su manejo y extracción del Semen a la “Granja porcina Gullancay”



perteneciente al Cantón Guachapala. Para el procesamiento del Plasma Seminal, El empleo de Radiación Ultravioleta y Reconstitución seminal el equipo de Radiación UV-C se colocó en el Laboratorio de Biotecnología de Reproducción en la granja Irquis de la Universidad de Cuenca, que está ubicada en el km 23 de la vía a Girón – Pasaje. Y el cultivo Bacteriológico lo realizó el Laboratorio “Biomicrolab” ubicado en la Ciudad de Cuenca (Calle Cantón Paute y Av. de las Américas).



**Gráfico 3.- Granja Experimental Irquis – Universidad de Cuenca Fuente: Google Hearth**

#### **Cuadro 2.- Características de la ubicación.**

<b>Lugar</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Longitud X</b>	<b>Latitud Y</b>	<b>Altitud Z</b>
Granja “Gullancay”	17-20 °C	75° 38'00"	96°95'30"	2230 msnm
Lab. “Irquis”	12-15 °C	79° 03' 42"	3° 03' 36"	2663 msnm

**Fuente: Universidad de Cuenca; GAD Guachapala.**

#### **3.2.2.- Animales**

En esta Investigación se utilizaron los eyaculados de 4 cerdos entrenados, sexualmente maduros de líneas sintéticas especializadas en producción de carne, con condición corporal de 2,5 a 3 en escala de 1-5, en condición de salud aparentemente sanos, de 1 a 3 años de edad, con un correcto desarrollo y simetría testicular, libre de parásitos, probados reproductivamente y alimentados a base de concentrado (2,5 Kg)/día/animal más forraje y agua ad libitum.

#### **3.2.3.- Descripción de las unidades de análisis**

Las muestras seminales incluidas en el estudio para la obtención del plasma seminal se caracterizaban por presentar una coloración blanquecina cremosa, volumen de 80ml, olor suigéneris, concentración espermática mayor de  $300 \times 10^6/\text{ml}$ . motilidad individual mayor a 90%.

### 3.2.4.- Recolección

La recolección se realizó utilizando la técnica de “mano enguantada”, con una frecuencia de recolección de 1 eyaculado/cerdo cada 5 días. Recolectándose la fracción rica o espermática en un promedio de 80ml/ eyaculado. El eyaculado se trasladó en frascos estériles de capacidad de 100ml dentro de una caja térmica a una temperatura de 18 °C inmediatamente luego de la recolección al laboratorio de Biotecnología de la Universidad de Cuenca para los respectivos tratamientos. En el laboratorio se realizó una evaluación inicial de motilidad en masa y la motilidad individual progresiva (MIP) de cada muestra. La motilidad en masa fue categorizada en un rango de 0 a 5 de acuerdo al siguiente cuadro.

**Cuadro 3.-** Clasificación de la Motilidad en Masa

Valor	Clase	Descripción
5	Muy Buena	Ondas y remolinos de movimiento muy rápidos
4	Buena	Movimientos vigorosos, pero las ondas y remolinos no son rápidos
3	Regular	Ondas de movimiento lento
2	Pobre	No se aprecian ondas, pero si movimiento de la muestra
1	Muy Pobre	Muy poco movimiento
0	Muertos	Ningún Movimiento

**Fuente:** Hernández, 2011





Para la valoración de Motilidad Progresiva se consideró el Movimiento Rectilíneo Progresivo en un porcentaje de 0 a 100% (Hernández, 2011).

### **3.2.5.- Manejo del Plasma Seminal (PS) y tratamientos con UV-C**

Las muestras seminales fueron centrifugadas a 1000rpm por 10 minutos para la obtención del plasma seminal, de este sobrenadante se tomaron 5 volúmenes iguales (8ml) para someterlas a los tratamientos de radiación UV-C propuestos. El PS fue colocado en cajas Petri hasta cubrir 5mm de espesor (Ver anexo 10). Para el tratamiento de radiación se utilizó una lámpara de UV-C, con una longitud de onda de 254nm de irradiación, una potencia de 12 voltios (Elite ® D-395). Para tomar las muestras de PS y tratarlo con radiación UV-C se empleó una Cámara de Flujo Laminar (BBS.H I800) evitando la posible contaminación medioambiental. El muestreo para el cultivo bacteriológico fue realizado inmediatamente luego de cada tratamiento, recolectándose una muestra por tratamiento de 3 ml con jeringa estéril, la muestra fue identificada y trasladada al Laboratorio de microbiología para su respectivo cultivo microbiológico y análisis bacteriano de la cantidad de Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/ml) en plasma seminal porcino tratado y no tratado con radiación UV-C. El plasma tratado fue empleado para la reconstitución seminal y evaluación inmediata con un pellet de espermatozoides fresco.

### **3.2.6.- Reconstitución y Evaluación de la calidad espermática**

La reconstitución seminal con el PS tratado y el pellet fresco se la realizó a una concentración de 1:200 y se procedió a realizar la evaluación espermática inmediata considerando: Motilidad Individual Progresiva (MIP), Vitalidad Espermática e Integridad de la membrana Plasmática.

#### **- Motilidad individual progresiva por el método convencional.**

Se colocó una gota de 10  $\mu$ l de la reconstitución sobre el portaobjeto temperado a 37°C se cubrió con un cubreobjetos a la misma temperatura. Se observó en el microscopio (CX31RBSFA) equipado con platina térmica a 37°C utilizando el lente



20X y 40X, se observaron varios campos y se valoró el porcentaje de espermatozoides con movimiento rectilíneo progresivo.

#### - **Vitalidad Espermática**

Para el cálculo del porcentaje de espermatozoides vivos y muertos se colocó una gota de 5  $\mu$ l del semen reconstituido y se mezcló con una gota de nigrosina y dos gotas de eosina temperadas a 37°C, sobre el portaobjeto a la misma temperatura. Se realizó un frotis y se procedió a secar sobre una platina térmica. Se observó en el microscopio con el lente 20X y 40X, se contabilizaron en un promedio de 200 células, se consideró vivos a los espermatozoides no teñidos por poseer una membrana intacta que evita que penetre la tinción y muertos a los espermatozoides teñidos con colorante, obteniendo el porcentaje de vitalidad.

#### - **Anormalidades Espermáticas**

Esta evaluación se lo realizó a partir de las mismas placas que se utilizaron para evaluar vitalidad espermática. Se observó al microscopio con lente de 20X y 40X, se contabilizaron en un promedio de 200 células y se obtuvo un porcentaje de anomalías (cabeza desprendida, cola desprendida, gota citoplasmática, cola doblada, dobles colas, microcefalia, macrocefalia).

#### - **Prueba de endósmosis de la membrana (HOST)**

Para determinar el estado de la membrana y la capacidad fecundante del espermatozoide, se temperó a 37°C 200  $\mu$ l de una solución hipoosmótica (100 mosmol/l) constituida por 490 mg de citrato de sodio y 900 mg de fructosa en 100 ml de agua destilada en la estufa a 37°C de temperatura por un lapso de 30 minutos posteriormente se agregó 20  $\mu$ l de semen reconstituido con plasma seminal sometido a UV-C y se incubó a la misma temperatura tras 1 hora y se fijó una muestra en solución de formol al 3%. Para su valoración microscópica se colocó en un portaobjetos 10  $\mu$ l de la muestra y se dejó secar sobre una platina térmica durante 1 minuto, posterior se observa en el lente de 20X y 40X. Se consideró HOS positivo a aquellos espermatozoides en los que se observó cualquier grado de torsión helicoidal



de la cola ("swelling"), contándose 100 espermatozoides por cada muestra obteniendo el porcentaje.

### **3.2.7.- Cultivo Bacteriano del Plasma Seminal**

Inmediatamente realizado los tratamientos respectivos con UV-C al PS en el laboratorio de Biotecnología de la Universidad de Cuenca, las muestras para su cultivo fueron trasladadas al laboratorio de bacteriología (Biomicrovet) donde realizaron la siembra, para lo cual utilizaron el medio Agar Sangre y EMB, por estriado de 10 µl de la muestra de PS, luego incubaron en una estufa por 24 hrs. a 37°C para luego proceder a la lectura de acuerdo al crecimiento bacteriano en UFC/ml. Ver Anexo 6 (Fotografía 1,2,3,4).

### **3.2.8.- Cultivo Bacteriano del Pellet**

Además también como complemento al estudio se realizó 8 cultivos bacterianos del pellet seminal sin tratamiento en el Laboratorio CA-LAB de la ciudad de Paute, en la que buscamos dilucidar si existe crecimiento bacteriano en el mismo, donde utilizamos el mismo procedimiento de cultivo descrito utilizado para el plasma seminal, los resultados encontrados fueron negativos. Ver Anexo 6 (Fotografía 5).

### **3.2.9.- Diseño Experimental**

Para esta investigación se planteó un Diseño de bloques al Azar (DBA), se emplearon 4 cerdos, cada uno considerado como un bloque, de estos se obtuvieron 4 eyaculados divididos cada uno en 5 alícuotas destinadas para cada tratamiento dando un total de 80 unidades experimentales.

### **3.2.10.- Tratamientos**

- **Tratamiento A.-** Sin exposición (Testigo o control)
- **Tratamiento B.-** 5 minutos de exposición a radiación UV-C
- **Tratamiento C.-** 10 minutos de exposición a radiación UV-C



- **Tratamiento D.-** 15 minutos de exposición a radiación UV-C
- **Tratamiento E.-** 20 minutos de exposición a radiación UV-C

### 3.2.11.- Variables de la investigación

#### - Variables independientes

- El tiempo de exposición del plasma seminal a la radiación UV-C.

#### - Variables dependientes

- Cantidad de Unidades Formadoras de Colonias por ml.
- Calidad espermática en semen reconstituido inmediatamente.
  - Motilidad individual progresiva.
  - Vitalidad espermática.
  - Anormalidades espermáticas.
  - Integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides

### 3.2.12.- Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se empleó el análisis de varianza seguido de la prueba de significación de Tukey 5% para las variables continuas y paramétricas; y, para las variables categóricas y variables no paramétricas se empleó la prueba de  $X^2$  y prueba H de Kruskal-Wallis mediante el empleo del programa SPSS ver 20.0.

## CAPITULO IV: RESULTADOS

### 4.1.- Efecto de los tratamientos (UV-C) sobre la carga bacteriana en el plasma seminal y los parámetros de calidad espermática pos reconstitución del semen porcino.

El análisis de resultados mediante la prueba de  $X^2$  indica que la concentración de UFC/ml en el plasma seminal fue dependiente ( $p < 0,01$ ) de la exposición a la radiación ultravioleta de onda corta reduciendo significativamente la carga bacteriana a partir de los 10 minutos de exposición viéndose su efecto mayoritario a partir de los 15 minutos de exposición a la radiación UV-C (Cuadro 4).

En cuanto a los parámetros de calidad seminal, no se encontró diferencias significativas entre vitalidad seminal, anormalidades y la prueba de endosmosis ( $p > 0,05$  para los tres parámetros); sin embargo, la motilidad individual progresiva se vio reducida numéricamente en los tratamientos D y E (exposición del plasma seminal a 15 y 20 minutos, respectivamente) (Cuadro 4).

**Cuadro 4.-** Resultados de R UV-C y la reconstitución en cada tratamiento.

Parámetros	Tratamientos				
	A	B	C	D	E
UFC $\geq 3,5 \times 10^3$ *	100,0% <sup>a</sup>	62,5% <sup>b</sup>	31,2% <sup>bc</sup>	18,8% <sup>c</sup>	6,2% <sup>c</sup>
MIP **	74,06 $\pm$ 13,07 <sup>a</sup>	67,81 $\pm$ 7,74 <sup>ab</sup>	65,31 $\pm$ 12,58 <sup>ab</sup>	57,81 $\pm$ 12,51 <sup>b</sup>	57,19 $\pm$ 11,40 <sup>b</sup>
Vitalidad ***	88,66 $\pm$ 7,32	89,19 $\pm$ 7,14	86,63 $\pm$ 8,62	88,31 $\pm$ 5,70	89,44 $\pm$ 6,16
Anormalidades Espermáticas ***	10,87 $\pm$ 8,09	13,13 $\pm$ 8,71	11,13 $\pm$ 8,19	14,38 $\pm$ 9,46	11,44 $\pm$ 9,84
Test HOST ***	34,31 $\pm$ 12,43	33,25 $\pm$ 16,09	33,81 $\pm$ 13,98	31,63 $\pm$ 12,67	29,00 $\pm$ 12,70

<sup>a,b,c</sup>.- letras diferentes en una misma fila indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ); \*- prueba de  $X^2$ ; \*\*.- prueba de Kruskal-Wallis; \*\*\*.- ANOVA. **A.-** Sin exposición a radiación UV-C; **B.-** 5 minutos de exposición a radiación UV-C; **C.-** 10 minutos de exposición a radiación UV-C; **D.-** 15 minutos de exposición a radiación UV-C; y **E.-** 20 minutos de exposición a radiación UV-C.



## CAPITULO V: DISCUSIÓN

La concentración de UFC  $\geq 3,5 \times 10^3$  se observa claramente en el tratamiento control (A) y en el tratamiento de 5 minutos de exposición a la radiación UV-C (B); sin embargo a partir de los 10 minutos de exposición las muestras con concentraciones de bacterias superiores al nivel establecido ( $3,5 \times 10^3$ ) disminuye sustancialmente por lo que el efecto bactericida en el plasma seminal porcino es evidente y puede ser aplicable como un método de esterilización. No obstante, para lograr que este método sea empleado se requiere realizar varios estudios en los que se analicen la existencia de cambios bioquímicos luego de que el plasma seminal sea tratado.

Existen diferentes discrepancias en cuanto a la cantidad de UFC/ml que se requiere para generar una afección reproductiva en los cerdos como ejemplo se mencionan  $10^4$  UFC/ml (Acosta et al., 2010);  $3,5 \times 10^3$  UFC/ml (Maroto et al. (2010);  $5 \times 10^3$  UFC/ml (Sa, 2014) y 1010 a 1012 UFC/ml (Kuster, 2015), esto demuestra una clara evidencia de la existencia bacteriana en el plasma seminal porcino. Sin embargo, los resultados por exposición del PS a la R UV-C a partir de los 10 minutos nos muestran una eliminación importante de las bacterias encontradas en el control o testigo (A: 100% > B: 62,5% > C: 31,2%  $\geq$  D: 18,8%  $\geq$  6,2% de contaminación). El 6,2% de contaminación del total de muestras de plasma seminal que se obtuvo en el tratamiento E puede deberse a que la cantidad de muestras no fue mayor numéricamente o que parte de las muestras analizadas, materiales o medios de transporte sufrieron una contaminación (Conza et al., 2004).

Investigaciones realizadas han demostrado que la radiación UV-C no afecta la composición química de las sustancias tratadas como también no altera las características organolépticas de los diferentes productos de consumo alimenticio (Vásquez et al., 2011; Cruz et al., 2014).

Si bien, existen diferencias estadísticas en la motilidad progresiva, esta puede deberse al tiempo transcurrido en analizar las muestras ya que existe una variación de 5 minutos pudiendo afectar los resultados, investigaciones demostraron que el espermatozoide de cerdo presenta una mayor sensibilidad al cambio de temperatura (Okazaki et al., 2012).



La distancia a la que se expuso las muestras a la radiación UV-C fue de 20 cm obteniéndose la mayor reducción de carga bacteriana por R UV-C a los 20 minutos de exposición (93,8%) en relación de al tratamiento B (37,5%) y comparados con el testigo (0,0%). Los resultados obtenidos son similares a los encontrados por Jones et al., (2013) quienes obtuvieron un 99% en la esterilización de líquidos (aguas, jugos, néctares), Beltrán, (2010), a una altura de 40cm encontró una mejor respuesta a R UV-C durante 7,5 minutos logrando disminuir la carga bacteriana entre el testigo  $2,5 \times 10^3$  a  $1,4 \times 10^2$ , disminuyendo un 92% de UFC/g de fresa.

Para inhibir la carga bacteriana del semen porcino los diluyentes de conservación seminal contienen antibióticos los que podrían generar resistencia bacteriana, Kuster (2015) encontró 5 especies de bacterias a los dos días de almacenado del semen refrigerado siendo la más frecuente *Pseudomonas* y *E. coli* (80%). Con la R UV-C por la afección directa que tiene al ADN celular de la bacteria hace que la bacteria no se reproduzca causando su destrucción total (Pietrobon, 2002; Vignoli, 2006; López-Días, 2012; Dai et al, 2012) sin liberación de toxinas, los resultados obtenidos demostraron que la reconstitución del semen porcino con plasma seminal no afectó significativamente los valores de un espermiograma básico como las anomalías, integridad de la membrana y vitalidad; aunque la motilidad se redujo significativamente probablemente por el tiempo que transcurrió en el análisis de las muestras una vez reconstituido el semen, o la radiación ultravioleta afectó este parámetro, dictamen que requiere su verificación mediante otros estudios.

Una de las propiedades del plasma seminal porcino es la de poseer propiedades antioxidantes gracias a sus iones de Zn y selenio ayudando a la funcionalidad espermática (López et al., 2013), por otro lado la UV-C sobre jugo de frutas disminuye la carga bacteriana pero también se vio afectada su capacidad antioxidante (López-Díaz, 2012), como también en néctar de mango se presentó una reducción del 19% en la actividad enzimática, datos que podrían justificar parte de la reducción de motilidad individual progresiva analizada.



## **CAPITULO VI: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

El estudio demostró que la aplicación de radiación ultravioleta de onda corta en la esterilización de plasma seminal porcino redujo sustancialmente la carga bacteriana presente estimándose que el tiempo necesario para obtener este efecto es a partir de los 15 minutos de exposición a una altura de 20cm con un espesor de plasma de 5mm.

Se recomienda realizar más estudios con respecto al plasma seminal tratado con este tipo de radiación y su uso en la reconstitución de semen porcino.





## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Acosta, M. (2010). Una reseña corta sobre la contaminación microbiológica del semen porcino y sus consecuencias. *Rev Comp Prod Porc*, 17(4), 273–280.
- Acosta, M., Arias, T., Páez, R., Espinosa, I., Martínez V., & Perdigón, R. (2011). Evaluación de la contaminación bacteriana de semen porcino puro y diluido. *Inst Inv Porc*.
- Aguero, G. (2012). Evaluación de las características seminales de Sementales Bovinos mediante el Analizador Seminal computarizado (CASA). Universidad Central de Venezuela.
- Allende, A., & Artés, F. (2003). UV-C radiation as a novel technique for keeping quality of fresh processed “Lollo Rosso” lettuce. *Food Research International*, 36, 739–746.
- Althouse, G., & Lu, K. (2005). Bacteriospermia in extended porcine semen. *Theriog*, 63 (2), 573-584.
- Althouse, G. (2008). Sanitary Procedures for the Production of Extended Semen. *Reprod Dom Anim*, 43(2), 374–378.
- Althouse, G., Levis, D., & Diehl, J. (2001). Semen Collection, Evaluation and Processing in the Boar. *Pork Information Gateway*, 1–6.
- Barranco, I., Tvarijonaviciute, A., Pérez-Patiño, C., Parrilla, I., Cerón, J., Martínez, E., Rodríguez-Martínez, H., Roca, J. (2015). High total antioxidant capacity of the porcine seminal plasma (SP-TAC) relates to sperm survival and fertility. *Sci Reports*, 5, 1–9.
- Barrios, B., Fernández, J., Muiño, B., Cebrián, P. (2005). Immunocytochemical localization and biochemical characterization of two seminal plasma proteins that protect ram spermatozoa against cold shock. *J Androl*, 26, 539-549.
- Beltran, A. (2010). Estudio de la Vida útil de Fresas (*Fragaria vesca*) mediante Tratamiento con Luz Ultravioleta de Onda Corta UV-C. Universidad Técnica de Ambato.
- Bonet, S., Casas, I., Holt, W., & Yeste, M. (2014). *Boar Reproduction: Fundamentals and new biotechnological trends* (Vol. 1). London: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.



Bresciani, C., Cabassi, C., Morini, G., Taddei, S., Bettini, R., Bigliardi, E., Parmigiani, E. (2014). Boar semen bacterial contamination in Italy and antibiotic efficacy in a modified extender. *Ital J Anim Sci*, 13(1), 83–87.

Caballero, I., Vázquez, J., Centurión, F., Rodríguez-Martínez, H., Parrilla, I., Roca, J., Cuello, C., Martínez, E. (2004). Comparative effects of autologous and homologous seminal plasma on the viability of largely extended boar spermatozoa. *Reprod Domest Anim*, 39(5), 370–375.

Campos, C. (2015). Efeitos da utilização de plasma seminal sintético (predil® mr-a®) no desempenho reprodutivo da porca. Universidad de Lisboa.

Conza, L., Calle, S., Echevarría, L., Falcón, N., & Cerón, M. (2004). Evaluación bacteriológica de semen de verracos usados como reproductores en granjas porcinas de la zona de Lurín, Lima. *Rev Inv Vet Perú*, 15(2), 163–165.

Cruz, M., Luna, L., Hernández, P., Luna, J., Guerreiro, J., & Ochoa, C. (2014). "Efecto de la luz ultravioleta de onda corta en factores de calidad de leche de coco (*Coccus nucífera*) almacenada en refrigeración." 9no Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia, 2014. 85-92.

Dai, T., Vrahas, M., Murray, C., & Hamblin, M. (2012). Ultraviolet C irradiation : an alternative antimicrobial approach to localized infections? *Expert Rev. Anti Infect. Theriog*, 10(2), 185–195.

De Mercado, E. (2011). Caracterización de la congelabilidad y mejora de los diluyentes de crioconservación espermática en porcino ibérico. Universidad Complutense de Madrid.

Domínguez, A. (2011). Intercambio de plasma seminal Porcino y valoración de la viabilidad espermática en semen refrigerado. Universidad Veracruzana.

Domínguez, J. C. (2015). Adición de plasma seminal para la mejora del semen criopreservado de porcino. *Especial Porcino Reproducción*, 14–18.

Domínguez, L., & Parzanese, M. (2009). Luz ultravioleta en la conservación de alimentos.



EcuRed, (2010). Luz ultravioleta. En línea: [https://www.ecured.cu/Luz\\_ultravioleta](https://www.ecured.cu/Luz_ultravioleta)

Fujita, Y., Mihara, T., Okazaki, T., Shitanaka, M., Kushino, R., Ikeda, C., Liu, Z., Richards, J., Shimada, M. (2011). Toll-like receptors (TLR) 2 and 4 on human sperm recognize bacterial endotoxins and mediate apoptosis. *Human Repro*, 26(10), 2799–2806.

Galarza, A. (2013). Eficacia de dos diluyentes: TRIS + Lecitina de soya (AndroMed®) y Tris + yema de huevo (Triladyl®), en la crioconservación de semen de toro de la raza Jersey en Cuenca – Ecuador. Universidad de Cuenca.

Hernández, M., Roca, J., Gil, M., Vázquez, J., Martínez, E. (2007). Ajustes en el condiciones de crioconservación reducen la incidencia de eyaculados con espermatozoides de baja congelabilidad, *Theriog*, 67, 1436-1445.

Hernández, A. (2013). Viabilidad y función espermática de semen descongelado de porcino adicionado con plasma seminal homólogo. Universidad Veracruzana.

Izquierdo, C., Gutiérrez, P., Hernández, M., Mancera, V., & Crispín, H. (2015). Obtención, evaluación y manipulación del semen de verraco en una unidad de producción mexicana. *Rev Vet*, 26(1), 69–74.

Jones, L., R., Worobo, & C., Smart. (2013). "UV Light Inactivation of Human and Plant Pathogens in Unfiltered Surface Irrigation Water. " *Journals AS Morg; Applied and Environmental Microbiology*, 80, 849 – 854.

Kubus. (2010). Inseminación Artificial Porcina. Madrid: kubus S.A.

Kuster, C., & Althouse, G. (2015). The Impact of Bacteriospermia on Boar Sperm Storage and Reproductive Performance. *Theriog*, 1–19.

Lenntech. (2016). En línea: <http://www.lenntech.es/uv-informacion.htm#ixzz4OhvznBwB>

López, A., Rijsselaere, T., Beek, J., Vyt, P., Van, A., & Maes, D. (2013). Boar seminal plasma components and their relation with semen quality. *Syst Bio Reprod Med*, 59(1), 5–12.



- López-Díaz, A., Palou, E., & López-Malo, A. (2012). Radiación ultravioleta en jugos de frutas : fundamentos y aplicaciones. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 2, 79–93.
- Maroto, L., Cruz, E., De Cupere, F., Van Driessche, E., Echemendia-Blanco, D., Machado, J., & Beeckmans, S. (2010). Bacterial contamination of boar semen affects the litter size. *Anim Reprod Sci*, 120 (1–4), 95–104.
- Mann T, Lutwak-Mann C. Male reproductive function and semen. Springer-Verlag, Berlin. 1981:495.
- Maxwell, W., De Graaf, S., Ghaoui, Rel-H., Evans, G. (2007). Seminal plasma effects on sperm handling and female fertility. *Soc Reprod Fertil Suppl*, 64, 13–38.
- Martínez, E., Peraza, P., & García, R. (1984). Evaluación bacteriológica de semen. Bovino. I. Sementales de la raza Holstein. *Rev Cub Reprod Anim*, 10, 7-15.
- Memarzadeh, F., Olmsted, R. N., Bartley, J. M., Arbor, A., & Hills, B. (2010). Applications of ultraviolet germicidal irradiation disinfection in health care facilities : Effective adjunct, but not stand- alone technology. *Am J Infect Control*, 38, 13–24.
- Mirjyn A 1999 Nuevas alternativas en la Inseminación Artificial. I curso internacional de reproducción porcina. México. 22-24.
- Morillo, M., Salazar, S., & Castillo, E. (2012). Evaluación del potencial reproductivo del macho bovino. Maracay: INIA.
- Morrell, J., & Wallgren, M. (2014). Alternatives to antibiotics in semen extenders: a review. *Pathogens*, 3, 934–946.
- Namula, Z., Sato, Y., Kodama, R., Morinaga, K., Luu, V., Taniguchi, M., Nakai, M., Tanihara, F., Kikuchi, K., Nagai T., & Otoi, T. (2013). Motility and fertility of boar semen after liquid preservation at 5°C for more than 2 weeks. *Anim Sci J*, 84,600-606.
- Okazaki, T., Akiyoshi, T., Kan, M., Mori, M., Teshima, H., & Shimada, M. (2012). Artificial Insemination With Seminal Plasma Improves the Reproductive Performance of Frozen-Thawed Boar Epididymal Spermatozoa. *J Andrology*, 33(5), 990–998.



Okazaki, T., & Shimada, M. (2012). New strategies of boar sperm cryopreservation: Development of novel freezing and thawing methods with a focus on the roles of seminal plasma. *Anim Sci J*, 83(9), 623–629.

Orzolek, A., Wysocki, P., Strzeżek, J., Koziorowska-Gilun, M., Dziekońska, A., & Kordan, W. (2015). Boar sperm quality in relation to presence of sp32-like protein in spermatozoa - preliminary studies. *Bulletin Vet Inst Pulawy*, 59(2), 279–286.

Pech, A., Centurión, F., Rodríguez, J., Segura, J., Aké, J. (2011). Effect of the addition of seminal plasma, vitamin E and incubation time on post- thawed sperm viability in boar semen. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 14, 965-971.

Pietrobon, E. (2012). Desinfecção por Luz Ultravioleta. En línea: <http://ecured.cuwww.agualatinoamerica.com/docs/pdf/3-4-02inter.pdf>

Rodríguez-Martínez, H., Kvist, U., Ernerudh, J., Sanz L., & Calvete, J. (2011). Seminal plasma proteins: what role do they play? *American J Reprod Immunol*, 66(1), 11-22.

Rodríguez-Martínez, H. (2014). Current status and perspectives of artificial insemination in pigs.

Rudolf, G., & De Alba, C. (2014). Important steps for introducing young boars in semen production. *SpermNotes*, 49, 2–8.

Sa, J., Choil, H., Kim, J., Hong, K., Kim, W., Kim, H., Park, C., Chung, H. (2014). Effect of Different Inoculation Concentration of *Escherichia coli* on Boar Sperm Quality and Reproductive Performance in Sow.

Sánchez R 2000 Estudio y control de la patología seminal en porcino.1994. En línea: <http://www.3tres3.com/opinion/ficha.php?id=1451>.

Sancho, S., & Vilagran, I. (2014). The Boar Ejaculate: Sperm Function and Seminal Plasma Analyses. In *Boar Reproduction: Fundamentals and new biotechnological trends* (pp. 471–515). London: Springer.

Sepúlveda, L., Bussalleu, E., Yeste, M., Bonet, S. (2014). Effects of different concentrations of *Pseudomonas aeruginosa* on boar sperm quality. *Anim Reprod Sci*.



- Vásquez, V., Acevedo, M., Alva, C., Calderón, E., Carranza, P., Carrera, Y., Vásquez, J. (2010). Efecto de la dilución de chicha de maíz (*Zea mays*) y caudal de ingreso a un sistema de irradiación ultravioleta en el contenido de bacterias mesófilas. *Agro Sci*, 5(1), 6–14.
- Vignoli, R. (2006). Esterilización, desinfección y antisepsia. In *Temas de Bacteriología y virología médica* (pp. 609–630).
- Vilagra, I., Yeste, M., Sancho, S., Castillo, R., Oliva, R., & Bonet, S. (2015). Comparative analysis of boar seminal plasma proteome from different freezability ejaculates and identification of Fibronectin 1 as sperm freezability marker. *Andrology*, (3), 345–356.
- Vilela, D. (2014). Influencia del plasma seminal en la criopreservación espermática y en la separación de espermatozoides X e Y en la especie porcina. Universidad de Murcia.
- Yeste, M. (2015). "Recent Advances in Boar Sperm Cryopreservation: State of the Art and current Perspectives". *Reproduction in Domestic Animals*. pp 71-79. En línea <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/rda.12569/full>.



## ANEXOS

## Anexo 1.- Pruebas de Chi-cuadrado ( $X^2$ ) para recuento bacteriano

**Tabla de contingencia Categorización del plasma seminal por recuento Bacteriano \* Tratamientos**

			Tratamientos					Total
			A	B	C	D	E	
Categorización del plasma seminal por recuento Bacteriano	<=3,5 UFC	Recuento	0 <sub>a</sub>	6 <sub>b</sub>	11 <sub>b, c</sub>	13 <sub>c</sub>	15 <sub>c</sub>	45
		% dentro de Tratamientos	0,0%	37,5%	68,8%	81,2%	93,8%	56,2%
	>3,5 UFC	Recuento	16 <sub>a</sub>	10 <sub>b</sub>	5 <sub>b, c</sub>	3 <sub>c</sub>	1 <sub>c</sub>	35
		% dentro de Tratamientos	100,0%	62,5%	31,2%	18,8%	6,2%	43,8%
Total	Recuento		16	16	16	16	16	80
	% dentro de Tratamientos		100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Cada letra de subíndice indica un subconjunto de Tratamientos categorías cuyas proporciones de columna no difieren significativamente entre sí en el nivel ,05.

**Pruebas de chi-cuadrado**

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	37,079 <sup>a</sup>	4	,000
Razón de verosimilitudes	45,682	4	,000
Asociación lineal por lineal	34,334	1	,000
N de casos válidos	80		

a. 0 casillas (0,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 7,00.





## Anexo 2.- Prueba de Kolmogorov-Smirnov para las variables en estudio (normalidad)

Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra

		Motilidad Individual Progresiva	Vitalidad	Anormalidades Espermáticas	Test HOST	Categorización del plasma seminal por recuento Bacteriano
N		80	80	80	80	80
Parámetros normales <sup>a,b</sup>	Media	64,4375	88,4449	12,1863	32,4004	1,44
	Desviación típica	12,99936	6,95117	8,76224	13,43296	,499
Diferencias más extremas	Absoluta	,159	,074	,129	,101	,372
	Positiva	,159	,049	,129	,084	,372
	Negativa	-,128	-,074	-,082	-,101	-,308
Z de Kolmogorov-Smirnov		1,418	,666	1,152	,902	3,328
Sig. asintót. (bilateral)		,036	,766	,140	,389	,000

a. La distribución de contraste es la Normal.

b. Se han calculado a partir de los datos.

La prueba de normalidad indica que los datos siguen una distribución normal en las variables de Vitalidad espermática, anomalidades espermáticas y prueba de HOST. Se estableció que las variables MIP y recuento bacteriano no siguen una distribución normal por lo que para su análisis se empleó la prueba de H de Kruskal-Wallis.

### Anexo 3.- Prueba del Estadístico de Levene para la homogeneidad de las varianzas.

Prueba de homogeneidad de varianzas				
	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Vitalidad	,273	4	75	,895
Anormalidades	,860	4	75	,492
Espermáticas	,901	4	75	,468
Test HOST				

El estadístico de Levene para homogeneidad de las varianzas indica que las variables Vitalidad espermática, Anormalidades espermáticas y HOST pueden ser sometidas al análisis de varianza.



#### Anexo 4.- Análisis de varianza de las variables paramétricas.

ANOVA de un factor						
		Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Vitalidad	Inter-grupos	78,614	4	19,653	,394	,812
	Intra-grupos	3738,567	75	49,848		
	Total	3817,180	79			
Anormalidades Espermáticas	Inter-grupos	145,513	4	36,378	,461	,764
	Intra-grupos	5919,862	75	78,931		
	Total	6065,375	79			
Test HOST	Inter-grupos	296,690	4	74,172	,399	,809
	Intra-grupos	13958,423	75	186,112		
	Total	14255,112	79			

El análisis de varianza indica que no existe diferencias significativas en las variables analizadas ( $p > 0,05$ ).

### Anexo 5.- Prueba de Kruskal-Wallis para las variables no paramétricas

Rangos		
Tratamientos	N	Rango promedio
Motilidad Individual Progresiva	A	56,34
	B	48,47
	C	42,22
	D	28,41
	E	27,06
	Total	80

**Estadísticos de contraste<sup>a,b</sup>**

	Motilidad Individual Progresiva
Chi-cuadrado	19,963
gl	4
Sig. asintót.	,001

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación:  
Tratamientos

## Anexo 6.- Análisis de Laboratorio

## Fotografía 1.- Análisis de 20 muestras del Plasma Seminal



## BACTERIOLOGICO

Fecha: 09 de julio de 2016

Orden N°: 4228

Especie: Porcina

Propietario:

A petición de: Dr. Wilmer Ordoñez

Muestra: Semen

N° de Muestra	Resultado
1	MNPC/ml
2	17 UFC/ml
3	8 UFC/ml
4	MNPC/ml
5	MNPC/ml
6	MNPC/ml
7	19 UFC/ml
8	MNPC/ml
9	27 UFC/ml
10	0 UFC/ml

N° de Muestra	Resultado
11	MNPC/ml
12	MNPC/ml
13	5 UFC/ml
14	MNPC/ml
15	MNPC/ml
16	MNPC/ml
17	MNPC/ml
18	MNPC/ml
19	31 UFC/ml
20	MNPC/ml

- **UFC:** Unidades Formadoras de Colonias.
- **MNPC:** Muy Numerosas Para Contar.

Estos resultados son válidos solo para las muestras analizadas  
y deben ser evaluados en su contexto clínico por un médico veterinario.

  
 Dr. Jaime Maldonado R.  


## Fotografía 2.- Análisis de 20 muestras del plasma seminal



### BACTERIOLOGICO

Fecha: 13 de julio de 2016

Orden N°: 4234

Especie: Porcina

Propietario:

A petición de: Dr. Wilmer Ordoñez



Muestra: Semen

N° de Muestra	Resultado
1	36 UFC/ml
2	32 UFC/ml
3	0 UFC/ml
4	0 UFC/ml
5	0 UFC/ml
6	5 UFC/ml
7	0 UFC/ml
8	1 UFC/ml
9	0 UFC/ml
10	0 UFC/ml

N° de Muestra	Resultado
11	MNPC/ml
12	MNPC/ml
13	63 UFC/ml
14	51 UFC/ml
15	19 UFC/ml
16	4 UFC/ml
17	0 UFC/ml
18	2 UFC/ml
19	2 UFC/ml
20	0 UFC/ml

- **UFC:** Unidades Formadoras de Colonias.
- **MNPC:** Muy Numerosas Para Contar.

Estos resultados son válidos solo para las muestras analizadas y deben ser evaluados en su contexto clínico por un médico veterinario.

  
 Dr. Jaime Maldonado R.  


### Fotografía 3.- Análisis de 20 muestras del plasma seminal



#### BACTERIOLOGICO

Fecha: 20 de julio de 2016

Orden N°: 4240

Especie: Porcina

Propietario:

A petición de: Dr. Wilmer Ordoñez

Muestra: Semen

N° de Muestra	Resultado
1	0 UFC/ml
2	2 UFC/ml
3	1 UFC/ml
4	0 UFC/ml
5	0 UFC/ml
6	0 UFC/ml
7	0 UFC/ml
8	0 UFC/ml
9	0 UFC/ml
10	1 UFC/ml

N° de Muestra	Resultado
11	0 UFC/ml
12	1 UFC/ml
13	0 UFC/ml
14	0 UFC/ml
15	1 UFC/ml
16	0 UFC/ml
17	1 UFC/ml
18	0 UFC/ml
19	1 UFC/ml
20	1 UFC/ml

- **UFC:** Unidades Formadoras de Colonias.
- **MNPC:** Muy Numerosas Para Contar.

Estos resultados son válidos solo para las muestras analizadas y deben ser evaluados en su contexto clínico por un médico veterinario.

  
 Dr. Jaime Maldonado R.  


#### Fotografía 4.- Análisis de 20 muestras del plasma seminal



#### BACTERIOLOGICO

Fecha: 23 de julio de 2016

Orden N°: 4245

Especie: Porcina

Propietario:

A petición de: Dr. Wilmer Ordoñez

Muestra: Semen

N° de Muestra	Resultado
1	1 UFC/ml
2	0 UFC/ml
3	0 UFC/ml
4	0 UFC/ml
5	MNPC/ml
6	0 UFC/ml
7	0 UFC/ml
8	1 UFC/ml
9	0 UFC/ml
10	0 UFC/ml

N° de Muestra	Resultado
11	31 UFC/ml
12	2 UFC/ml
13	1 UFC/ml
14	0 UFC/ml
15	0 UFC/ml
16	0 UFC/ml
17	0 UFC/ml
18	1 UFC/ml
19	0 UFC/ml
20	0 UFC/ml

- **UFC:** Unidades Formadoras de Colonias.
- **MNPC:** Muy Numerosas Para Contar.

Estos resultados son válidos solo para las muestras analizadas y deben ser evaluados en su contexto clínico por un médico veterinario.

  
 Dr. Jaime Maldonado R.  






## Fotografía 5.- Análisis de 8 muestras del pellet seminal



**Q.F. Andrea Calderón Abad.**  
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

Dir.: García Moreno 5-17 y Sucre  
(Frente a Western Union )  
Telef.: 2250003  
Cel.: 0985112976  
Email.: calab.paute@gmail.com

### CA-LAB LABORATORIO CLINICO

Dirección: García Moreno 5-17 y Sucre "Frente a Western Union"

Teléfono: 2250003

cel: 0985112976

Horario: Lunes a Viernes 07H15 - 17H00 Sabado y Domingo 8H00 - 13H00

PACIENTE: WILMER ORDOÑEZ

FECHA: 02 DE MARZO DEL 2017

EDAD: 39 AÑOS

PEDIDO: 10

MEDICO:

## RESULTADOS DE EXAMENES

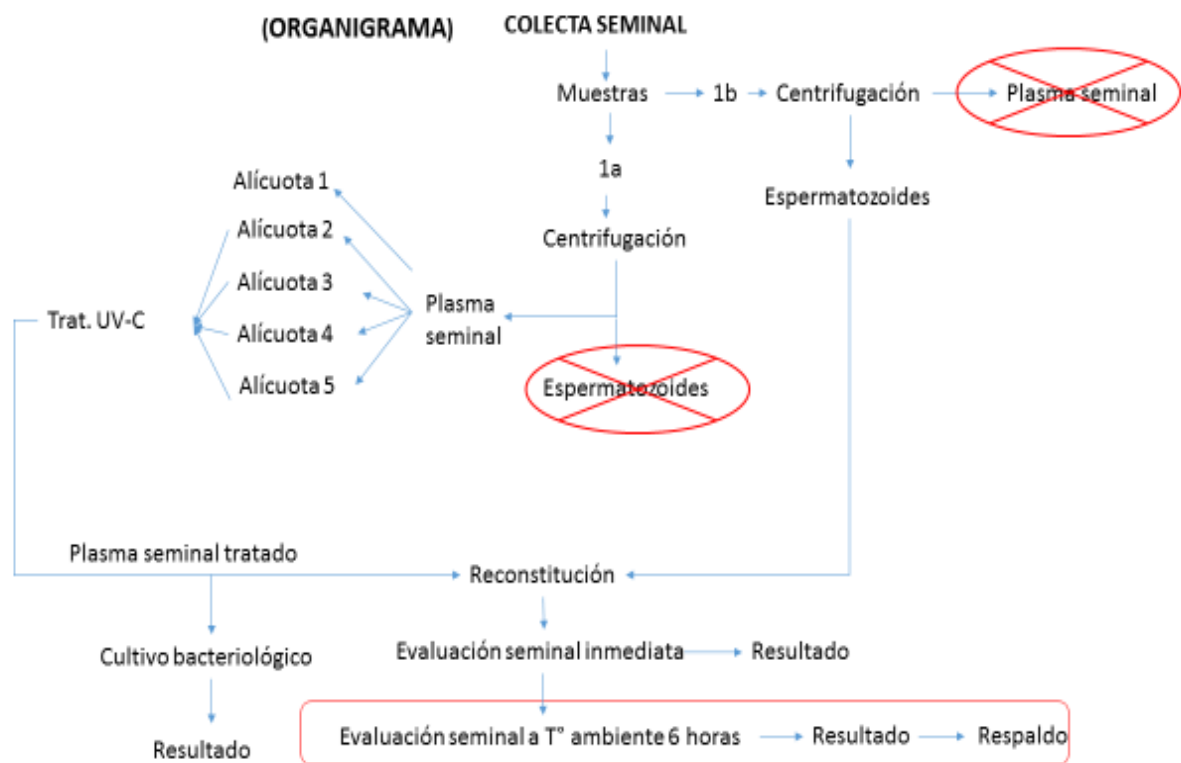
### CULTIVO Y ANTIBIOGRAMA DE PELLET

TOMA DE MUESTRA:	DIRECTA
MUESTRA:	SEMEN DE PORCINO
GERMEN AISLADO:	NO HUBO DESARROLLO BACTERIANO.
COLONIAS	0
# DE CULTIVOS REALIZADOS:	4
MEDIOS UTILIZADOS:	AGAR SANGRE AGAR EMB
RESULTADOS:	NEGATIVOS PARA TODOS LOS CULTIVOS

Q.F. ANDREA CALDERON  
Química Farmacéuta  
Reg. 1029-2016-1777905

VALIDADO POR QF. ANDREA CALDERÓN ABAD.

## Anexo 7.- Organigrama de trabajo utilizado en el laboratorio Irquis.





## Anexo 8.- Registro de resultados para la reconstitución

### Evaluación de semen porcino reconstituido en plasma seminal tratado con UV-C

Fecha: .....

#### Bloque C1. (Grande)

Bloque C1. (Grande)		Calidad Espermática					
		M. I. P.	Vitalidad Espermática			Membrana P.	
			E-N			HOST - ORT	
			%	Foto	%	Malform. %	Foto
Muestra	Exposición						
1	0 UV						
2	5UV						
3	10UV						
4	15UV						
5	20UV						

#### Bloque C2. (Negro)

Bloque C2. (Negro)			Vitalidad Espermática			Membrana P.	
		M. I. P.	E-N			HOST - ORT	
		%	Foto	%	Malform. %	Foto	%
Muestra	Exposición						
6	0UV						
7	5UV						
8	10UV						
9	15UV						
10	20UV						

#### Bloque C3. (Bravo)

Bloque C5: (Bravo)

Muestra	Exposición		Vitalidad Espermática			Membrana P.	
		M. I. P.	E-N			HOST - ORT	
		%	Foto	%	Malform. %	Foto	%
11	0UV						
12	5UV						
13	10UV						
14	15UV						
15	20UV						

#### Bloque C4. (Pequeño)

Bloque 34: (Pequeño)			Vitalidad Espermática			Membrana P.	
		M. I. P.	E-N			HOST - ORT	
		%	Foto	%	Malform. %	Foto	%
16	0UV						
17	5UV						
18	10UV						
19	15UV						
20	20UV						

**Anexo 9.- FOTOGRAFÍAS (trabajos en la Granja)**  
**Inicio de colecta aseo del prepucio.**



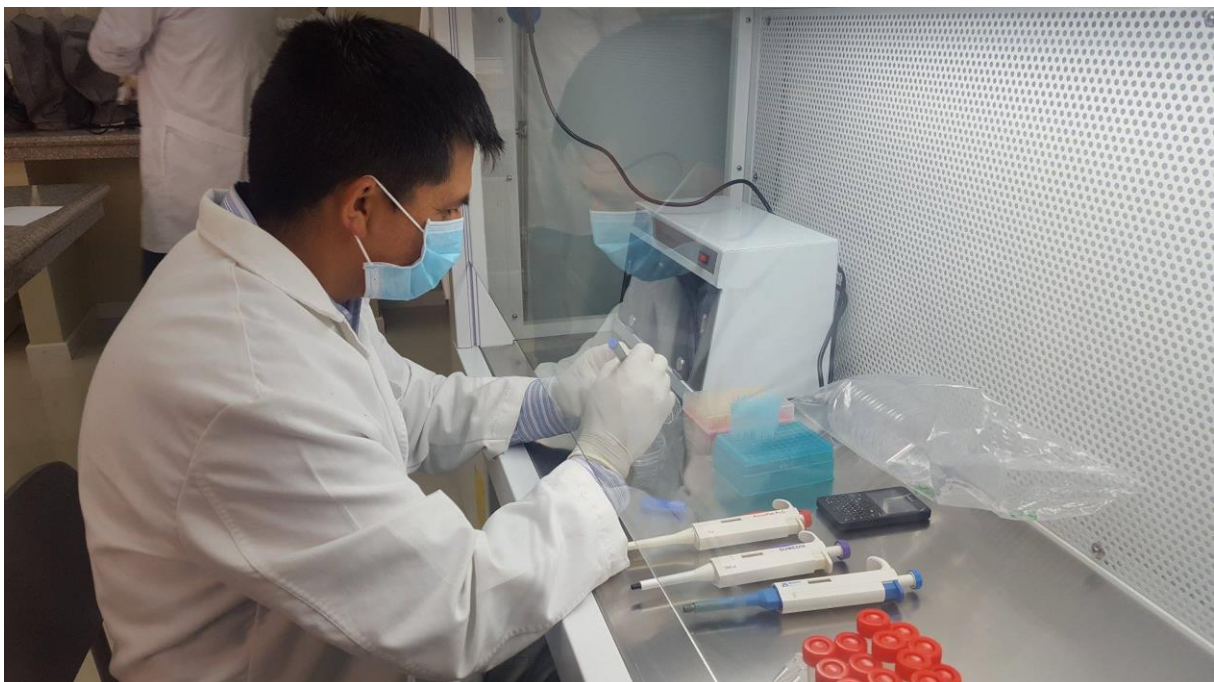


## **Extracción Seminal**

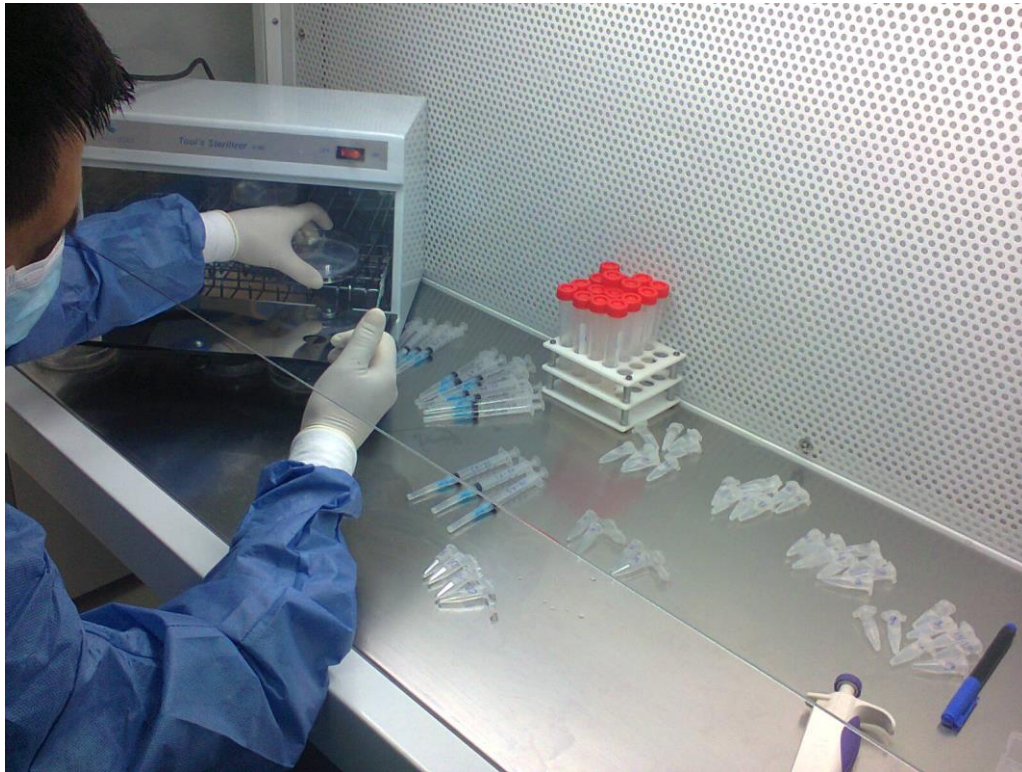


### **Anexo 10.- FOTOGRAFÍAS (trabajos en el Laboratorio)**

#### **Trabajo (Cámara de Flujo Laminar)**



### Colocación de muestras en la cámara UV-C.

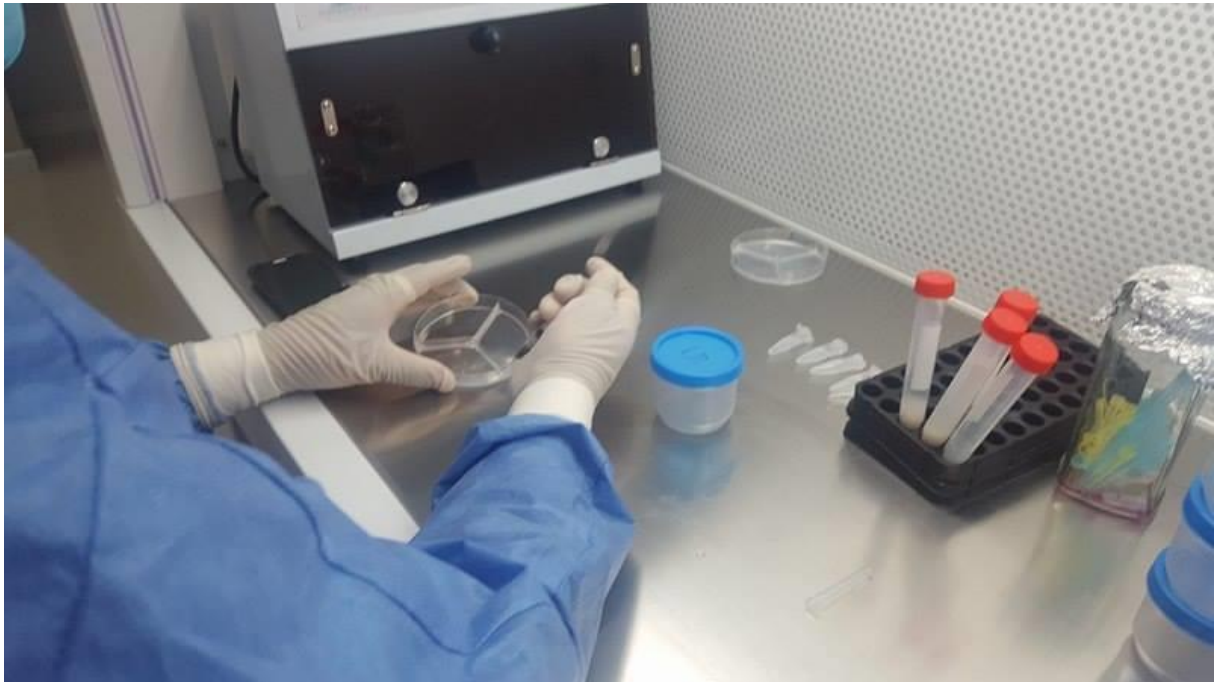


### Plasma Seminal tratado con UV-C





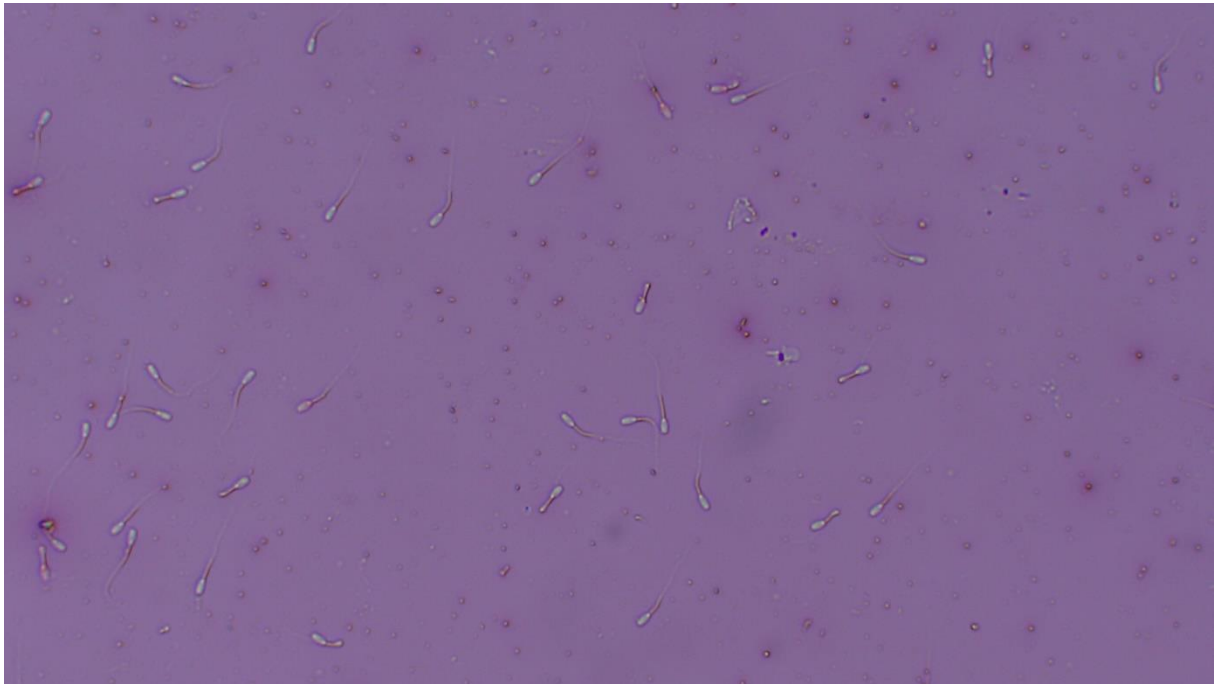
## Toma de muestras para envío al laboratorio



## Bacterias Cultivadas



## Prueba Vitalidad espermática



## Prueba Host

